柞蚕蛹解除滞育过程中海藻糖合成酶基因的表达变化

黄 伶[1], 孙良振[1], 王 勇[1,*], 汝玉涛[1], Muhammad IRFAN[1], 姜义仁[1], 石生林[1], 杨瑞生[1], 李喜升[2], 秦 利[1,*]

(1. 沈阳农业大学生物科学技术学院, 辽宁省昆虫资源工程技术研究中心, 沈阳 110866;
2. 辽宁省蚕业科学研究所, 辽宁凤城 118100)

摘要:【目的】克隆柞蚕 *Antheraea pernyi* 海藻糖合成酶(trehalose-6-phosphate synthase, TPS)基因,并对其进行组织表达分析,探讨该基因在柞蚕滞育蛹解除滞育过程中的表达规律,为阐明柞蚕滞育期间碳水化合物代谢规律与蛹滞育解除的关系提供数据支持。【方法】利用 PCR 及 3′RACE 技术从柞蚕幼虫脂肪体组织中克隆得到 TPS 基因,并进行生物信息学分析;RT-PCR 检测该基因在柞蚕幼虫各组织中的表达分布,进一步采用 Real-time PCR 分析柞蚕滞育蛹解除滞育过程中该基因在脂肪体组织和血淋巴中的表达量变化。【结果】克隆获得柞蚕海藻糖合成酶基因并命名为 *ApTPS*。其开放阅读框长 2 487 bp,编码 828 个氨基酸,蛋白预测分子量为 93.19 kD,等电点(pI)4.61;无信号肽,无跨膜区。蛋白质亚细胞定位预测该蛋白定位于细胞质中;蛋白质结构域分析表明,ApTPS 有两个保守功能区:TPS(第 22 - 497 位氨基酸)和 TPP(第 532 - 772 位氨基酸)。组织特异性分析表明, *ApTPS* 基因在柞蚕幼虫脂肪体中表达量最高;柞蚕解除滞育过程中, *ApTPS* 在脂肪体和血淋巴中的表达量均有所升高,且显著高于对照组($P<0.05$),但血淋巴中表达量的升高滞后于脂肪体。【结论】结果提示 ApTPS 参与了柞蚕蛹滞育中碳水化合物代谢调控并在其中发挥重要作用,与柞蚕蛹滞育解除关系密切。

关键词: 柞蚕; 滞育; 海藻糖合成酶; 基因表达; 滞育解除

中图分类号: Q965 **文献标识码**: A **文章编号**: 0454-6296(2016)09-0938-10

Changes in the expression of trehalose-6-phosphate synthase gene in *Antheraea pernyi* (Lepidoptera: Saturniidae) during pupal diapause termination

HUANG Ling[1], SUN Liang-Zhen[1], WANG Yong[1,*], RU Yu-Tao[1], Muhammad IRFAN[1], JIANG Yi-Ren[1], SHI Sheng-Lin[1], YANG Rui-Sheng[1], LI Xi-Sheng[2], QIN Li[1,*] (1. Liaoning Engineering and Technology Resource Center for Insect Resource, College of Bioscience and Biotechnology, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China; 2. The Sericultural Research Institute of Liaoning, Fengcheng, Liaoning 118100, China)

Abstract:【Aim】This study aims to clone the trehalose-6-phosphate synthase (TPS) gene in *Antheraea pernyi*, to analyze its tissue distribution, and to profile the expression patterns of the gene during diapause termination so as to provide data support for clarifying the relationship between carbohydrate metabolism and diapause termination in diapause pupae of *A. pernyi*.【Methods】The TPS gene was cloned from the

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项(CARS-22); 辽宁省农业领域青年科技创新人才培养计划项目(2014010); 辽宁省教育厅一般项目(L2014255, L2015488)

作者简介: 黄伶, 女, 1989 年 12 月生, 辽宁丹东人, 硕士研究生, 研究方向为昆虫生理学, E-mail: ling_74521@126.com

* 通讯作者 Corresponding authors, E-mail: yongwang216@163.com; qinli1963@163.com

收稿日期 Received: 2016-04-28; 接受日期 Accepted: 2016-08-02

fat body of *A. pernyi* larvae using PCR and 3′ RACE technology, and the putative amino acid sequence was analyzed by bioinformatics methods. The expression pattern of the gene in different tissues of *A. pernyi* larvae was analyzed by RT-PCR. The relative expression levels of the gene in haemolymph and fat body in the process of diapause termination of *A. pernyi* larvae were measured using real-time PCR technology.【Results】The TPS gene of *A. pernyi* was cloned and named *ApTPS*. It has an open reading frame (ORF) of 2 487 bp, encoding 828 amino acid residues. The encoded protein is estimated to be 93.19 kD with an isoelectric point (pI) about 4.61, and has no signal peptide and transmembrane region. Subcellular localization analysis indicated that ApTPS targets to cytoplasm. Homology search showed that ApTPS has two conserved domains: TPS (22 –497 amino acids) and TPP (532 –772 amino acids). Tissue-specific mRNA expression profiling showed that *ApTPS* was mainly expressed in the fat body of *A. pernyi* larvae. In the process of diapause termination, the expression levels of *ApTPS* in both haemolymph and fat body were up-regulated and significantly higher than those in the control groups ($P<0.05$). The elevated expression of the gene in the haemolymph, however, occurred later than that in the fat body.【Conclusion】The results suggest that ApTPS participates in the regulation of carbohydrate metabolism and plays a significant role in diapause process of *A. pernyi* pupae. There is a close relationship between *ApTPS* expression and the diapause termination of *A. pernyi* pupae.

Key words: *Antheraea pernyi*; diapause; trehalose-6-phosphate synthase; gene expression; diapause termination

为适应复杂多变的生存条件,度过周期性的不利于生存的外界环境,昆虫在进化过程中形成了多种应对措施,其中包括昆虫的滞育(diapause)。滞育是一种不能发育的生理状态,当不利环境到来之前,昆虫接受某些信号刺激,触发内环境的相应变化,主动停止发育,当接受到特定信号刺激后又会解除滞育状态(Tauber and Tauber, 1976; Hodek, 1996)。昆虫进入滞育后,发育极其缓慢,呼气量微弱,体内含水量降低,抗逆性增强,各种激素及相应的代谢机制发生变化。这些特征利于昆虫度过极端环境并且最终达到与生殖活动一致(赵章武和黄永平, 1995)。

昆虫滞育可分为卵滞育、预1龄幼虫滞育、幼虫滞育、蛹滞育及成虫滞育等类型(徐卫华, 2008)。滞育期间,昆虫体内生理生化发生一系列的变化,尤其是体内海藻糖含量的变化对滞育的影响很大(Nomura and Ishikawa, 2001)。海藻糖是一种非还原性双糖,广泛存在于微生物、植物及无脊椎动物中,它既是一种贮藏性糖类,又可参与应激代谢,是昆虫主要的血糖成分(Chung, 2008)。昆虫发生滞育,海藻糖积累,成为主要保护剂及稳定剂以保证昆虫免受不良环境侵害(唐斌等, 2014)。海藻糖主要在昆虫脂肪体中合成,再释放到血淋巴中,海藻糖-6-磷酸合成酶(trehalose-6-phosphate synthase, TPS)在海藻糖合成中起关键作用(Chung, 2008)。目前已在黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*、甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua*、棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 和白背飞虱 *Sogatella furcifera* 等多种昆虫中克隆获得 TPS 基因(Chen *et al*., 2002; Xu *et al*., 2009; Tang *et al*., 2010; 张道伟等, 2012)。褐飞虱 TPS 基因在脂肪体中表达量相对较高,整个发育过程中其表达量相对稳定(Chen *et al*., 2010)。但葱蝇 *Delia antiqua* 滞育蛹和非滞育蛹中 TPS 基因的表达量却存在差异,相对于非滞育蛹,滞育蛹中 TPS 基因的表达量滞育前期较高,进入滞育后降低,滞育后期又有所上升(李源等, 2013)。相似的变化规律在棉铃虫中也有所报道(Xu *et al*., 2009),表明海藻糖在昆虫滞育过程中供应能量,同时也在抵抗不良环境中发挥作用。

柞蚕 *Antheraea pernyi* 属鳞翅目(Lepidoptera)大蚕蛾科(Saturniidae),是我国特有的泌丝昆虫,茧丝可应用于纺织、国防、医疗等领域,幼虫、蛹及成虫均可食用,同时柞蚕也是重要的以蛹滞育的模式昆虫之一,柞蚕滞育生理及相关研究可为其他鳞翅目昆虫的研究提供参考。柞蚕蛹滞育的发生受幼虫期尤其是大蚕期光周期影响,短光照(<14.5 h)有利于柞蚕蛹滞育,同时长光照(>14.5 h)光周期也影响柞蚕蛹滞育的解除(秦利, 2003)。柞蚕蛹滞育后,其体内糖代谢发生变化,糖原与海藻糖相互转化以帮助其度过滞育期(陆明贤等, 1992)。柞蚕蛹滞育及滞育解除与碳水化合物代谢有密切关系,有关柞

蚕体内海藻糖含量变化与滞育关系的研究将为阐明柞蚕滞育期碳水化合物代谢机制奠定基础。因此分析柞蚕滞育期海藻糖在柞蚕蛹滞育过程中的含量变化,研究柞蚕海藻糖合成酶基因及其在滞育解除过程中表达规律,对于解析柞蚕海藻糖与滞育解除的关系具有重要意义。

本研究克隆了柞蚕海藻糖合成酶基因,研究了该基因在柞蚕幼虫各组织的分布情况,探讨了柞蚕蛹解除滞育过程中海藻糖合成酶基因的表达模式,可为揭示柞蚕解除滞育过程中体内糖类物质调控机理提供数据支持。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫处理及取样

供试二化性柞蚕品种为“选大1号”,由沈阳农业大学柞蚕研究所保育。选取5龄第4天幼虫的体壁、肌肉、丝腺、脂肪体、卵巢/精巢、马氏管、中肠及血淋巴等组织,3头为一组混合,共取3组,以液氮速冻,于-80℃冰箱储存用于组织表达谱分析。

一化性柞蚕品种为“豫大1号”滞育蛹,每日采用300 lx照度光照诱导解除滞育,光周期为17L:7D,每5 d解剖取脂肪体组织、血淋巴,直至解除滞育羽化为止,3头为一组,共取3组,以液氮速冻,于-80℃冰箱储存;另取自然光照(12L:12D)处理为对照。

1.2 主要试剂

总RNA提取试剂RNAiso Plus、PrimeScript™ 1st Strand cDNA Synthesis Kit、PrimeScript™ RT Reagent Kit with gDNA Eraser、SYBR Premix Ex Taq™、pMD18-T载体等购自大连宝生物工程有限公司,胶回收试剂盒、质粒小提试剂盒及EasyTaq DNA聚合酶购自康为世纪生物科技有限公司,其他试剂均为国产分析纯,引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

1.3 RNA的提取及cDNA的合成

总RNA的提取参照RNAiso Plus说明书进行,以琼脂糖凝胶电泳检测所提取的RNA质量,并采用Nanodrop 2000微量紫外分光光度计测定RNA浓度。按照PrimeScript™ 1st Strand cDNA Synthesis Kit说明书方法合成第一链cDNA,-20℃保存。实时定量表达分析所用cDNA则依照PrimeScript™ RT Reagent Kit with gDNA Eraser说明进行第一链cDNA的合成。

1.4 柞蚕TPS基因的克隆

依据本实验室建立的柞蚕中肠转录组数据,筛选注释为柞蚕海藻糖合成酶的Unigene序列,利用Primer Premier 5.0软件设计引物(表1)。50 μL PCR反应体系:cDNA模板2 μL,上/下游引物各2 μL,EasyTaq DNA聚合酶25 μL,补充水至总体系50 μL。扩增程序:95℃预变性3 min;95℃ 30 s,55℃ 30 s,72℃ 45 s,循环34次;72℃延伸5 min。PCR产物经1.2%琼脂糖凝胶泳检测,扩增产物经快速凝胶回收试剂盒回收后连接pMD18-T载体并转化大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5α,阳性克隆经菌落PCR验证无误后送上海生工生物工程有限公司测序。

1.5 3′ RACE扩增

采用3′ RACE Out Primer及特异性引物TPS-3′-F(表1)进行3′ RACE扩增。50 μL PCR反应体系:cDNA模板2 μL,引物各2 μL,EasyTaq DNA聚合酶

表1 *TPS*引物名称及序列

Table 1 The primers of *TPS* used in this study

引物名称 Primer name	引物序列(5′-3′) Primer sequences	引物用途 Use of primers
TPS-F	ATGACTAACACGAGTGGAACGAAT	*TPS*片段扩增
TPS-R	GCGTCTTCATCTGTAAGGTCGTC	Amplification of *TPS* fragment
TPS-3′-F	CGACCTTACAGATGAAGACGCTAT	*TPS* 3′端扩增
3′ RACE out primer	GGCCACGCGTCGACTAGTAC	3′end amplification of *TPS*
Sq-TPS-F	TTACACCCTGACGGAAGCAAG	*TPS*半定量RT-PCR
Sq-TPS-R	GCGTCTTCATCTGTAAGGTCGTC	Semi-quantitative RT-PCR of *TPS*
Sq-actin-F	CCAAAGGCCAACAGAGAGAAGA	内参基因半定量RT-PCR
Sq-actin-R	CAAGAATGAGGGCTGGAAGAGA	Semi-quantitative RT-PCR of reference gene
Q-TPS-F	GGTTTGGACTGGAGCGAGAG	*TPS*实时定量PCR
Q-TPS-R	GAGGAAGCGATGCGGAATG	qPCR of *TPS*
Q-actin-F	ACCAACTGGGACGACATGGAGAAA	内参基因qPCR
Q-actin-R	TCTCTCTGTTGGCCTTTGGGTTGA	qPCR of reference gene

25 μL，补充水至总体系 50 μL。扩增程序：95℃ 预变性 3 min；95℃ 30 s，55℃ 30 s，72℃ 30 s，循环 34 次；72℃ 延伸 5 min。PCR 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶泳检测。扩增产物经快速凝胶回收试剂盒回收后连接 pMD18-T 载体并转化 *E. coli* DH 5α，阳性克隆以菌落 PCR 验证无误后送上海生工生物工程有限公司测序，将所得测序结果进行拼接。

1.6　柞蚕 TPS 基因序列分析及系统发育树的构建

利用美国国立生物技术信息中心 NCBI 在线工具 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html 搜索基因开放阅读框。蛋白质等电点（isoelectric point，pI）、分子质量（molecular weight，MW）、氨基酸组成和理化性质等的分析使用 http://web.expasy.org/protparam/。蛋白质结构域的预测使用 http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM = blastp&PAGE_TYPE = BlastSearch&LINK_LOC = blasthome，信号肽预测使用 http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/，利用 http://swissmodel.expasy.org/interactive 进行同源建模及三级结构预测分析，跨膜区的预测使用 http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/，蛋白亚细胞定位预测采用 http://www.bioinfo.tsinghua.edu.cn/SubLoc/eu_predict.htm。利用 Clustal X 软件对同源海藻糖合成酶基因的氨基酸序列进行比对，利用在线工具 http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html 对序列比对结果进行处理。利用 NCBI 搜寻 TPS 氨基酸序列并进行比对，以中国对虾 *Fenneropenaeus chinensis* 的同源序列（GenBank 登录号：ACD74843）为外群，用 MEGA 5.0.5 软件的邻接法（Neighbor-Joining，NJ）法生成系统发育树。

1.7　柞蚕 TPS 基因组织特异性分析

以柞蚕 *TPS* 序列为模板设计半定量 RT-PCR 引物（表 1），以柞蚕 5 龄幼虫各组织 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。选取柞蚕 *β-actin* 基因为内参。PCR 反应程序：94℃ 预变性 3 min；94℃ 变性 30 s，55℃ 退火 30 s，72℃ 延伸 15 s，28 个循环；72℃ 延伸 10 min。产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测并作归一化处理，同时送上海生工生物工程测序验证。

1.8　柞蚕蛹解除滞育期间柞蚕 TPS 基因的表达

实时定量 PCR 引物见表 1，以去除基因组 DNA 的 cDNA 为模板，对解除滞育期间柞蚕蛹脂肪体及血淋巴中柞蚕 *TPS* 表达量进行实时定量 PCR 分析，*β-actin* 基因为内参。参照 SYBR Premix Ex Taq™ 使用说明书配制反应体系及程序设置。

1.9　数据统计与分析

获得数据采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法进行分析，利用 SPSS 20.0 数据分析软件，采用单因素 ANOVA 方差分析 Duncan 氏法对数据进行处理，比较柞蚕蛹解除滞育期间柞蚕 TPS 基因的表达变化。

2　结果与分析

2.1　柞蚕 TPS 基因的克隆及序列分析

经 PCR 扩增及 3′ RACE 扩增分别得到片段大小约 1 900 bp 和 900 bp 的特异性条带（图 1：A，B），测序结果拼接后得到柞蚕 TPS 基因完整 ORF 序列，命名为 *ApTPS*。

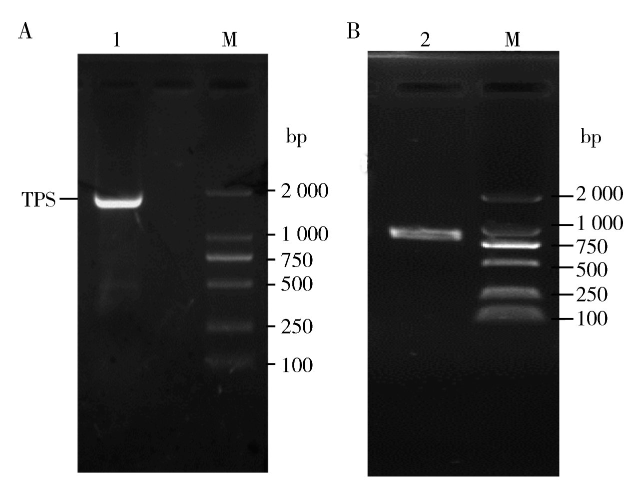


图 1　柞蚕 *ApTPS* 基因中间片段（A）和 3′末端（B）PCR 扩增的电泳图

Fig. 1　Electrophoretogram of PCR amplification products of the intermediate segment（A）and 3′ end（B）of *ApTPS* in *Antheraea pernyi*

M：DL2000 Marker；1：*ApTPS* 中间片段 Intermediate segment of *ApTPS*；2：*ApTPS* 3′末端片段 3′ end of *ApTPS*.

ApTPS 基因的 ORF 长度为 2 487 bp，编码 828 个氨基酸，3′非翻译区为 642 bp，包含 poly（A）尾巴。蛋白质结构域分析结果表明，ApTPS 有两个保守功能区：TPS（第 22 – 497 位氨基酸）和 TPP（第 532 – 772 位氨基酸）（图 2）。

生物信息学分析结果表明，*ApTPS* 编码蛋白质的分子量为 93.19 kD，等电点为 4.61。无信号肽，无跨膜区。二级结构预测表明，ApTPS 的 α-螺旋（alpha helix）、延伸链（extended strand）及无规则卷曲（random coil）的比例分别为 40.1%，15.7% 和 44.2%，蛋白质亚细胞定位预测该蛋白位于细胞质中。ApTPS 蛋白 3D 结构同源建模基于 1uqu，氨基酸序列一致性为 39.64%（图 3）。

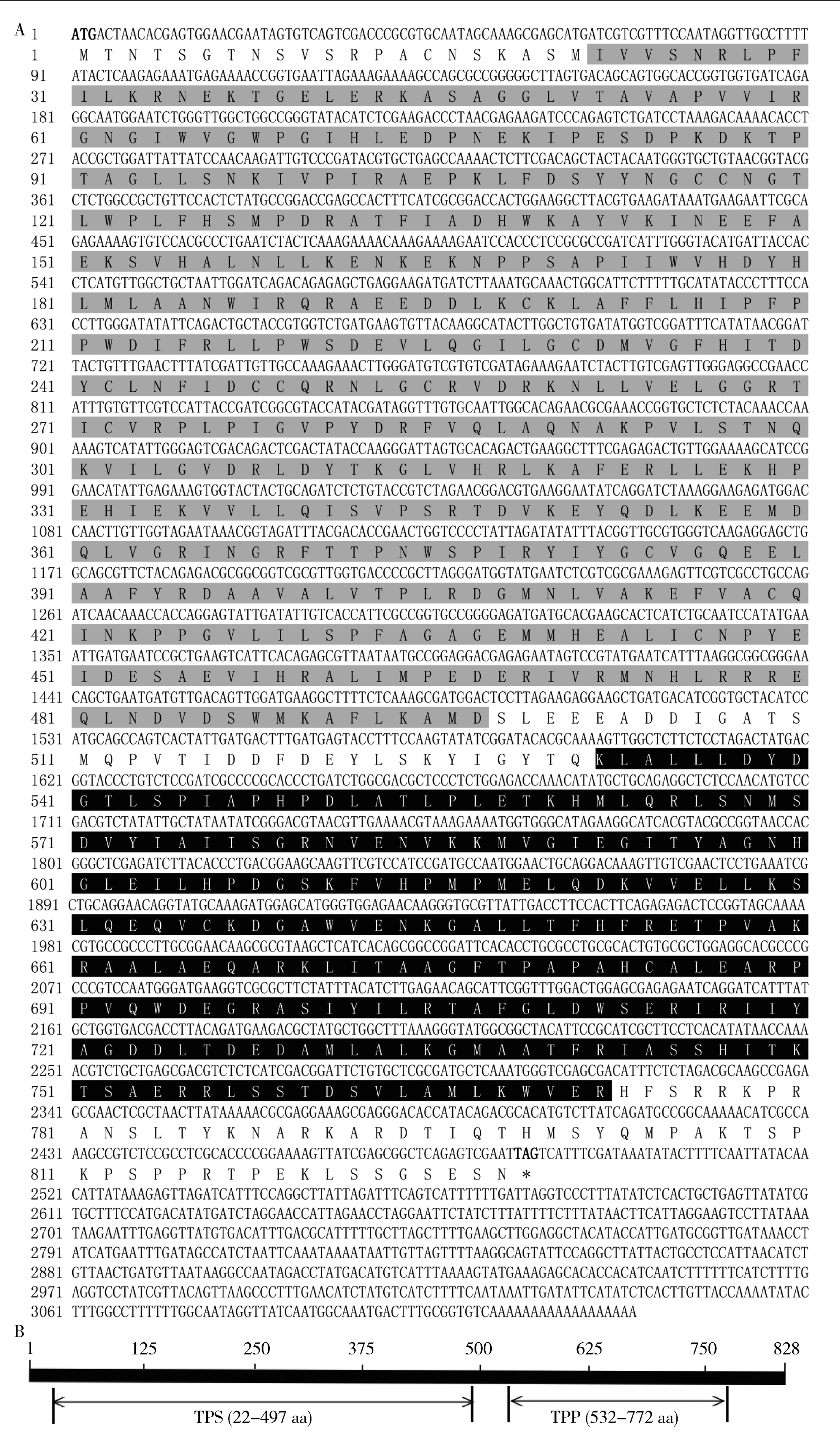


图 2 柞蚕 *ApTPS* 基因的核苷酸序列和推导的氨基酸序列(A)及其编码蛋白的保守功能域(B)

Fig. 2 Nucleotide and deduced amino acid sequences (A) and the conserved domains (B) of the encoded protein of *ApTPS* in *Antheraea pernyi*

灰色阴影表示 TPS 结构域,黑色阴影表示 TPP 结构域。The conserved domains of TPS are shaded in grey, and the conserved domains of TPP are shaded in black.



图 3　预测的柞蚕 ApTPS 蛋白三维结构

Fig. 3　Predicted three-dimensional structure of ApTPS in *Antheraea pernyi*

2.2　ApTPS 同源比对及系统进化分析

利用 *ApTPS* 基因推测所得氨基酸序列在 GenBank 数据库中搜索昆虫海藻糖合成酶序列并比对分析，ApTPS 与斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* TPS（GenBank 登录号：ADA63844.1）、东亚飞蝗 *Locusta migratoria* TPS（GenBank 登录号：ABV44614.1）、达氏按蚊 *Anopheles darlingi* TPS（GenBank 登录号：ETN66003.1）氨基酸一致性分别为 92%，77% 和 76%（图 4）。

采用从 NCBI 数据库中搜索到的来自 15 种不同昆虫已知的海藻糖合成酶氨基酸序列构建系统进化树，以中国对虾 *Fenneropenaeus chinensis* 同源 TPS 序列（GenBank 登录号：ACD74843）为外群进行系统

```
S. litura         1 AVAPVVIRGGGIWVGWPGIHLDDPNEKIPGSNPNDKTPTAGLLSEKIVPIHADPKLFDSYYNGCCNGTFWPLFHSMPDRATFIADHWKAYIKCNEEFAEK
A. pernyi         1 AVAPVVIRGNGIWVGWPGIHLEDPNEKIPESDPKDKTPTAGLLSNKIVPIRAEPKLFDSYYNGCCNGTLWPLFHSMPDRATFIADHWKAYVKINEEFAEK
L. migratoria     1 AVAPVVVQGHGLWVGWPGIHLENPDEPIPESNPNDNTPTAGLLSKKVVAVCVEPGKFDSYYNGCCNGTFWPLFHSMPDRAVFLAEHWKNYYSVNELFAEK
A. darlingi       1 AVAPVVIKGKGLWVGWSGITLTDENEPIPESDPSDNTPTAGLLSEQVVSVNVEPQLFDSYYNGCCNGTFWPLFHSMPGRATFCADHWRSYYTVNKEFASR
consensus         1 ******..*.*.****.**.*....* **.* *.* ********...*... .*..************.********.**.*.*.**..*...*..**..

S. litura       101 TVHALHLLKQQKGKNGNSPPIVWVHDYHLMLAANWIRQRAEEDEIKCKLAFFLHIPFPPWDIFRLFPWSDEVLQGILGCDMVGFHITDYCLNFTDCCQRN
A. pernyi       101 SVHALNLLKENKEKNPPSAPIIWVHDYHLMLAANWIRQRAEEDDLKCKLAFFLHIPFPPWDIFRLLPWSDEVLQGILGCDMVGFHITDYCLNFIDCCQRN
L. migratoria   101 TIKALRCLLDEQ---PTATPLVWIHDYHLMLAANWVRQIAEESNLRLKLGFFLHIPFPPWDIFRLCPWSDEILQGILGNDMVGFHIEDYCLNFIDCCQRR
A. darlingi     101 TIEALEKCLKKN--THPGVPLIWIHDYHLMLAANWIREAADEKNLPYQMAFFLHIPFPPWDIFRLYPWSDEILQGMLACDMIGFHIRDYCLNFVDCCQRN
consensus       101 ...**...  ...  .....  *..*.***********.*..*.*.......***************.*****.***.*..**.****.******.*****.

S. litura       201 LGCRVDRKNLLVELGGRTICVRPLPIGVPFDRFVQLAQNAKPVLSTNQQVILGVDRLDYTKGLVHRLKAFERLLEKYPEHIEKVMLLQISVPSRTDVKEY
A. pernyi       201 LGCRVDRKNLLVELGGRTICVRPLPIGVPYDRFVQLAQNAKPVLSTNQKVILGVDRLDYTKGLVHRLKAFERLLEKHPEHIEKVVLLQISVPSRTDVKEY
L. migratoria   198 LGCRVDRKGLMVEHGGRTVIVRPLPIGIPYDRFVNMAEAAPKVLPTNQKFVLGVDRLDYTKGLVHRLKAFELLLEKYPEHIEEVTLLQISVPSRTDVKEY
A. darlingi     199 LGCRVDRKNLLVEHGGRSVRVRPLPIGIPFDRFVELAQTARKVINTNQKIILGVDRLDYTKGLVNRLKAFEVLLEKHPEHRENVSLLQISVPSRTDVKEY
consensus       201 ********.*.** ***...*******.*.****..*..*.  *..***...*************.******.**** ***.*.* ***************

S. litura       301 QDLKEEMDQLVGRINSRFTTPNWSPIRYIYGCVGQDELAAFYRDAAVALVTPLRDGMNLVAKEFVACQINKPPGVLIVSPFAGAGEMMHEALICNPYELD
A. pernyi       301 QDLKEEMDQLVGRINGRFTTPNWSPIRYIYGCVGQEELAAFYRDAAVALVTPLRDGMNLVAKEFVACQINKPPGVLILSPFAGAGEMMHEALICNPYEID
L. migratoria   298 QDLKEEMDQMVGRINGRFTTYNWSPIRYIYGQVGQDELAAFYRDAAVTLVTPLRDGMNLVAKEFVACQINEPPGVLIVSPFAGAGEMMHEALICNPYEIH
A. darlingi     299 QELKEEMDQLVGRINGRFTTANWSPIRYIYGCVGQEELAAFYREASVCLVTPLRDGMNLVAKEFVACQIHEPPGVLVVSPFAGAGETMHEALLCNPYELD
consensus       301 *.*******.*****.****.**********.***.*******.*.*.*********************.  *****..*********.*****.*****..

S. litura       401 DAAEVIHRALIMPEDERTVRMNHLRRREQLNDVDSWMKAFLKAMDSLEEEADDIGATSMQPVTIDDFDEYLSKYIGYTQKLALLLDYDGTLAPIAPHPDL
A. pernyi       401 ESAEVIHRALIMPEDERIVRMNHLRRREQLNDVDSWMKAFLKAMDSLEEEADDIGATSMQPVTIDDFDEYLSKYIGYTQKLALLLDYDGTLSPIAPHPDL
L. migratoria   398 TAAEVIHRALTMPEDERTLRMNYLRRREKLHDVNYWMKSFFKAMGSLREDGDDGLPTTMQPVTMDDFDEYLSKYLGNHHKLALLLDYDGTLAPIAPHPDL
A. darlingi     399 AAAEVIHRALTMPEDERTLRMSRMRRREMQNDVNSWMRQFLKAMGSLEE--DDIGTTTMQPVTVDDFDDYLLSYIGYNHKLALLLDYDGTLAPIAPHPDL
consensus       401 ..******** ******..**...****...** .**..*.*** **.*..**...*.*****.****.**..*.*..  ************.********

S. litura       501 ATLPLETKHTLQRLSNMSDVYIAIISGRNVDNVKNMVGIEGITYAGNHGLEILHPDGSKFVHPMPMELQDAVVDLLKALQEQVCKDGAWVENKGALLTFH
A. pernyi       501 ATLPLETKHMLQRLSNMSDVYIAIISGRNVENVKKMVGIEGITYAGNHGLEILHPDGSKFVHPMPMELQDKVVELLKSLQEQVCKDGAWVENKGALLTFH
L. migratoria   498 AILPPETKSVLERLSNMPDVYVAIISGRNVVNVKQMVGIEGITYAGNHGLEILHPDGSKFVHPMPSEFEDKVTDLLKALQEQVCREGAWVENKGALLTFH
A. darlingi     497 ATLPPETKNVLQRLSNHSDVYVAIISGRNVENVKQMVGIEGITYAGNHGLEILHPDGSKFVHPMPIEYEDKVSGLLKSLQDSVCGDGAWVENKGPLLTYH
consensus       501 *.** ***..*.****..***.********.***.******************************.*.  *.*..*** **..**..********.***.*

S. litura       601 YRETPVAKRAALAEQARKLITEAGFTPAPAHCALEARPPVEWDKGRASIYILRTAFGLDRSERIRIIYAGDDVTDEDAMLALKGMAATFRIASSHITKTS
A. pernyi       601 FRETPVAKRAALAEQARKLITAAGFTPAPAHCALEARPPVQWDEGRASIYILRTAFGLDWSERIRIIYAGDDLTDEDAMLALKGMAATFRIASSHITKTS
L. migratoria   598 YRETPMYLRAEMVAQAQTLIEQAGFKAGSAHCAIEAKPPVQWNKGRASLYILRTAFGVDWSERIRIIYAGDDVTDEDAMEALKGMAATFRVTSSHIVKTA
A. darlingi     597 YRETPVELRPAMVEKARQLIIQFGFRAAEAHCAIEAKPPVQWNKGRASIYILRTAFGVDWSERIKIIYAGDDMTDEDAMMALKGMAATFRVTNSQIVKTS
consensus       601 .****..  *...  ..*..**...**.  ..****.**.***.* .****.********.*.****.*******.******.**********.  .*.* **.

S. litura       701 AERRLSSTDSVLAMLKWVERHFSRRKPRANSLTYKNARKARDTIQMHMSYQMPAKTSPRHTPPLTPDKTSSGSESS
A. pernyi       701 AERRLSSTDSVLAMLKWVERHFSRRKPRANSLTYKNARKARDTIQTHMSYQMPAKTSPKPSPPRTPEKLSSGSESN
L. migratoria   698 AERRLPNTDSVLTMLKWLERHLSGREPRQD--------------ANGGPYRRPSKRKGCECKPKSAGKQC------
A. darlingi     697 AERRLPSTDSVLTMLKWVERHFMRRKPRANSLTYR--GKKKDCVKMQMAFDLVPNTSAANSAASSSDERD------
consensus       701 ***** .***** ****.***...*.**............................ ........ ......
```

图 4　柞蚕与其他昆虫同源海藻糖合成酶氨基酸序列比对分析

Fig. 4　Multiple alignment of amino acid sequences of TPS proteins from *Antheraea pernyi* and other species

TPS 序列来源及 GenBank 登录号 Origin of TPS proteins and their GenBank accession no：*S. litura*：斜纹夜蛾 *Spodoptera litura*，ADA63844.1；*A. pernyi*：柞蚕 *Antheraea pernyi*，KU977454；*L. migratoria*：东亚飞蝗 *Locusta migratoria*，ABV44614.1；*A. darlingi*：达氏按蚊 *Anopheles darlingi*，ETN66003.1；consensus：共有序列 Consensus.

进化分析。昆虫海藻糖合成酶可分为 6 个类群：昆虫纲的双翅目、鞘翅目、鳞翅目、直翅目、半翅目和甲壳纲的十足目。柞蚕与同为鳞翅目的斜纹夜蛾、甜菜夜蛾及大红斑蝶海藻糖合成酶聚合在同一进化分支上(图 5)。

2.3 *ApTPS* 基因组织表达谱

采用半定量 RT-PCR 检测柞蚕 5 龄幼虫各组织中 *ApTPS* 基因的表达量变化，柞蚕各组织中除在脂肪体的表达量较高外，在体壁、肌肉、马氏管、精/卵巢及血淋巴中也有表达(图 6)。

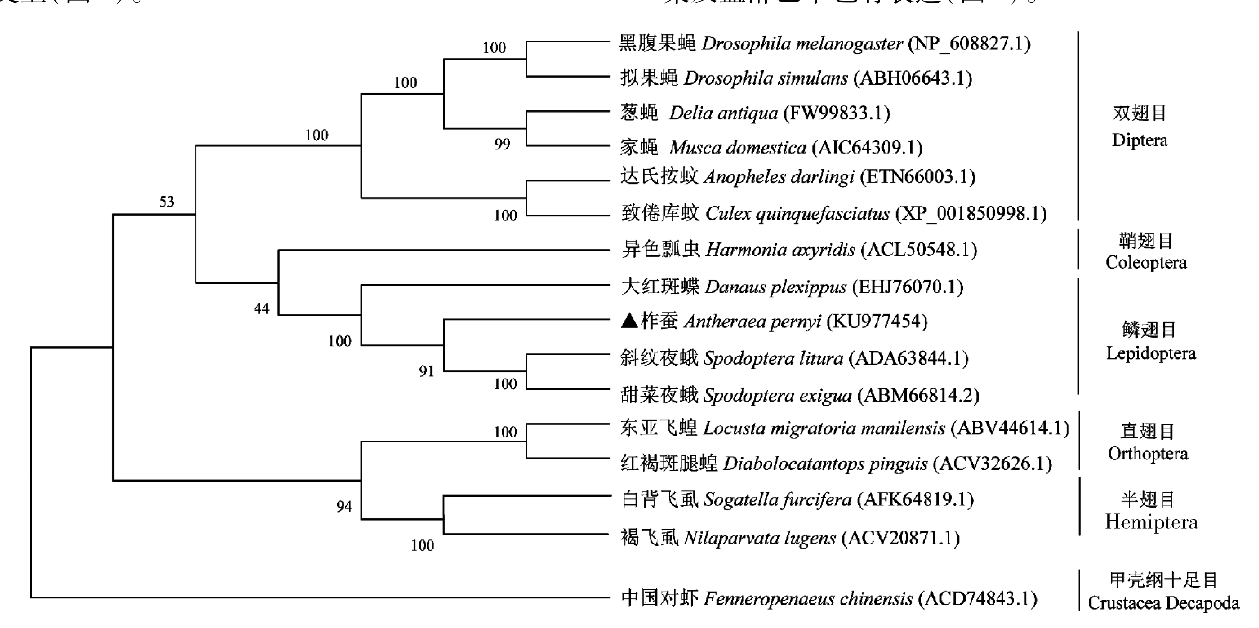


图 5 柞蚕和其他物种基于海藻糖合成酶氨基酸序列的系统进化树

Fig. 5 Phylognetic tree based on amino acid sequence of trehalose-6-phosphate synthase (TPS) from *Antheraea pernyi* and other species

采用 MEGA 5.0.5 软件的邻接法(Neighbor-Joining, NJ)法生成系统发育树，括号内为 TPS 的 GenBank 登录号；进化树分支置信度检测利用 Bootstrap 进行(1 000 次)，分支上的数字表示置信度。The tree was generated by MEGA 5.0 using the Neighbor-Joining (NJ) method. GenBank accession no. of TPS is in brackets. The topology was tested using bootstrap analyses (1 000 replicates), and numbers at nodes are bootstrap *P*-values.

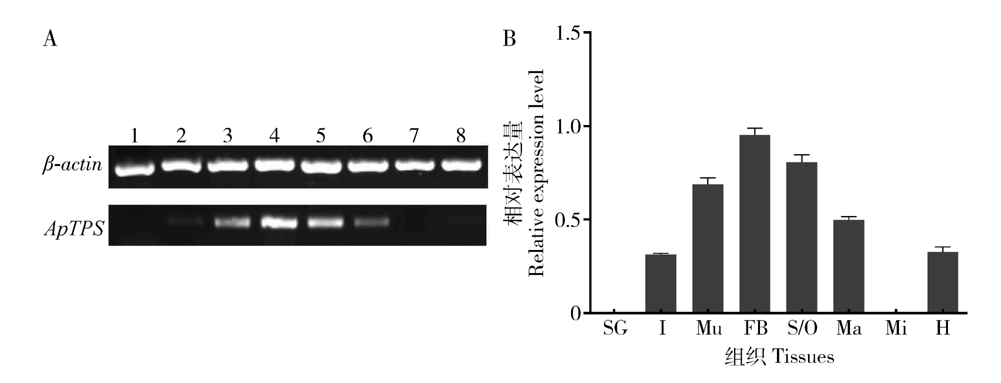


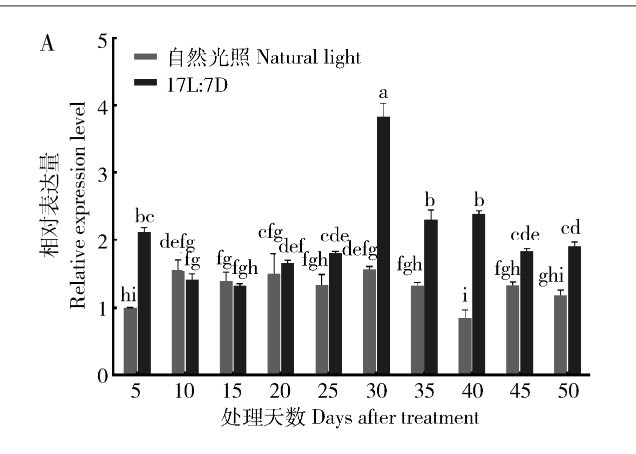
图 6 半定量 RT-PCR 检测 *ApTPS* 在柞蚕 5 龄第 4 天幼虫不同组织中的表达谱(A)和相对表达量(B)

Fig. 6 Expression profile (A) and relative expression level (B) of *ApTPS* in various tissues of the day-4 5th instar larvae of *Antheraea pernyi* assayed by semi-quantitative RT-PCR

1：丝腺 Silk gland (SG)；2：体壁 Integument (I)；3：肌肉 Muscles (Mu)；4：脂肪体 Fat body (FB)；5：精巢/卵巢 Spermaries/ovaries (S/O)；6：马氏管 Malpighian tubes (Ma)；7：中肠 Midgut (Mi)；8：血淋巴 Haemolymph (H).

2.4 柞蚕蛹滞育及解除滞育过程中 *ApTPS* 基因表达量变化

采用实时荧光定量 PCR 技术检测柞蚕滞育蛹解除滞育过程中脂肪体及血淋巴组织中 *ApTPS* 基因的相对表达量变化。结果表明，自然光照下柞蚕蛹维持滞育，*ApTPS* 相对表达量在脂肪体和血淋巴中基本保持稳定。长光照(17L:7D)处理后，柞蚕蛹逐步解除滞育，处理 30 d，*ApTPS* 在脂肪体中表达量显著升高($P < 0.05$)，之后虽有所下降，但相对自然光处理组仍维持较高水平；血淋巴中 *ApTPS* 相对表达量同样自 30 d 起显著升高($P < 0.05$)，第 40 天表达量最高，比脂肪体表达量最高时间延后 10 d，随后逐渐下降(图 7)。



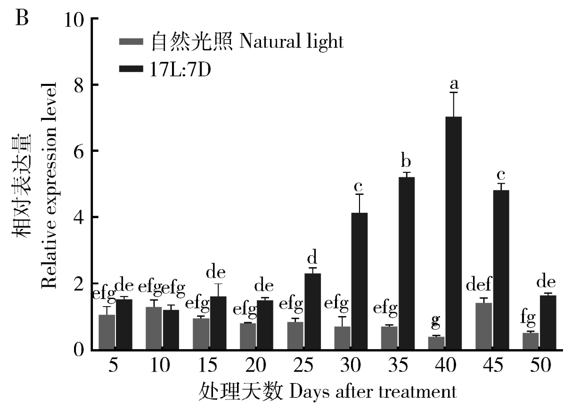


图 7　柞蚕蛹解除滞育过程中 *ApTPS* 在脂肪体(A)和血淋巴(B)中的相对表达量

Fig. 7　Relative expression level of *ApTPS* in the fat body (A) and haemolymph (B) of *Antheraea pernyi* pupae during diapause termination

本实验重复 3 次，误差线为平均值 ± 标准误(n = 3)，柱上不同字母表示经 Duncan 氏多重比较后差异显著($P < 0.05$)。This experiment was conducted in three replicates and the bar represents the means ± *SE* (n = 3), and different letters above bars show significant difference by Duncan's multiple range test ($P < 0.05$).

3　讨论

海藻糖是昆虫体内重要的血糖，占昆虫血淋巴糖含量的 80% ~90% (Howden and Kilby, 1956)。它是一种非还原性双糖，能以高浓度存在于昆虫体液中，其变化对昆虫碳水化合物的摄取及体内营养物质的动态平衡有积极作用(Thompson, 2003)。海藻糖作为一种能量储备，能为昆虫各组织器官提供能量，如昆虫飞行活动会使血淋巴中海藻糖被消耗、含量下降(Elbein *et al*., 2003)。低温和高温的诱导均可以促进德国小蠊海藻糖合成酶基因的表达量上升(陈静和张道伟, 2015)，这与该基因在异色瓢虫 *Harmonia axyridis* 中的表达规律大致相同(秦资等, 2012)，说明海藻糖在协助昆虫抵御不良环境中发挥重要作用。在滞育型和非滞育型棉铃虫中，海藻糖含量有显著差异，当注射滞育激素打破滞育后，海藻糖的含量急剧下降(Xu *et al*., 2009)。在既具有夏滞育又有冬滞育的葱蝇 *Delia antiqua* 中也发现了这一现象(Nomura and Ishikawa, 2001; 李源等, 2013)。柞蚕滞育蛹脂肪体糖原与血淋巴海藻糖相互转化，变化趋势呈现明显的"镜像关系"(陆明贤等, 1992)。表明海藻糖对昆虫的滞育和抗逆同样具有重要的作用，研究海藻糖的代谢规律能为揭示昆虫滞育及抗性机制提供依据。

海藻糖合成酶是海藻糖合成过程中的关键酶，生物体通过调控 TPS 基因的表达量调节海藻糖含量的升高或降低(Clark *et al*., 2009)。目前在昆虫中发现海藻糖合成途径主要为海藻糖合成酶(TPS)/海藻糖-6-磷酸脂酶(TPP)途径，但随着许多昆虫基因测序的完成，目前仅发现和克隆出 TPS 基因，并没有获得 TPP 基因(唐斌等, 2014)。对海藻糖 TPS/TPP 合成途径的进化研究表明，部分真核生物细胞中分别对应大肠杆菌 *OtsA* 和 *OtsB* 两个基因编码的 TPS 和 TPP 两个蛋白的基因，在长期进化过程中已经发生基因融合，由两个外显子共同参与编码真核生物的海藻糖合成酶(杨艳和李增波, 2008)。本研究克隆获得柞蚕海藻糖合成酶基因 *ApTPS*，其开放阅读框长 2 487 bp，编码 828 个氨基酸，蛋白质结构域分析表明，ApTPS 有两个保守功能区，推测分别为 TPS(第 22 – 497 位氨基酸)和 TPP(第 532 – 772 位氨基酸)。这与唐斌等(2014)认为昆虫海藻糖合成酶的氨基酸数量在 800 个以上，包括两个非常保守的 TPS 和 TPP 结构域这一结果相一致。从甜菜夜蛾中不仅克隆出包含 TPS 和 TPP 两个保守结构域的蛋白基因(GenBank 登录号: EF051258)，同时克隆出仅包含 TPS 结构域的 TPS 蛋白基因(GenBank 登录号: FJ792706)，其编码的蛋白长度为 588 个氨基酸，说明昆虫的 TPS 基因有可能具有不同的剪接体，可以分别行使 TPS 和 TPP 功能参与海藻糖的合成。本研究中，半定量 RT-PCR 检测 *ApTPS* 在柞蚕各组织的表达谱发现，*ApTPS* 在脂肪体中表达量最高，这与海藻糖在脂肪体中合成，然后释放到各组织相符。

光周期是诱发昆虫滞育最有力的环境因子，光照对于滞育的解除同样具有重要作用。采用 17L: 7D

光周期、1 883 lx 光照强度处理的柞蚕滞育蛹，光照处理 7 d 其解除滞育率达 60%；光照处理 14 d 其解除滞育率达 70%，光照处理 28 d 则达 100%（钱惠田，1978）。葱蝇非滞育蛹中 *TPS* 表达量趋于稳定，而滞育蛹滞育前期表达量较高，进入滞育后保持低表达，滞育后期表达量则又增加（Guo *et al*., 2015）。本研究采用 17L∶7D 光周期处理滞育的柞蚕蛹诱导滞育解除，研究柞蚕蛹滞育解除过程中海藻糖合成酶基因表达水平的变化，结果显示，*ApTPS* 基因在滞育蛹脂肪体及血淋巴中表达量相对稳定，随着滞育的解除其表达量逐渐升高，并出现峰值，随后有所下降；脂肪体中 *ApTPS* 基因表达量在光照处理 30 d 时达最高值，血淋巴中则在光照处理 40 d 时达到最大值。这些结果表明，滞育蛹对能量的需求较少且滞育期代谢活动相对稳定，随着滞育的解除，蛹体内生理代谢发生变化，能量需求逐渐增强，需要海藻糖提供能量供其发育。血淋巴中表达量峰值比脂肪体延后，可能由于脂肪体是海藻糖合成的主要场所，在接受滞育解除的信号后，*ApTPS* 基因表达，海藻糖在脂肪体中合成，然后释放到血淋巴等组织。

柞蚕是一种经济昆虫，同时也是重要的模式昆虫。一化性柞蚕区自然条件下一年仅能饲养一季蚕，营茧化蛹后即进入滞育，翌年春季羽化发育，漫长的滞育期将消耗大量营养物质，不利于越年制种，且容易病菌繁殖蔓延。因此在一化性地区，如何实现"一化二放"打破一化蛹滞育具有极大的生产意义及经济价值。已有研究表明，光周期是解除柞蚕滞育的有效途径，本研究表明采用 17L∶7D 光周期处理不仅能够解除柞蚕滞育蛹滞育，而且能够诱导 *ApTPS* 的表达。今后应进一步研究 *ApTPS* 的表达与提高柞蚕快速解除滞育关系的环境条件及分子机理，为人工控制柞蚕滞育的有效解除提供理论依据。

参考文献（References）

Chen J, Zhang D, Yao Q, Zhang J, Dong X, Tian H, Chen J, Zhang W, 2010. Feeding-based RNA interference of a trehalose phosphate synthase gene in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. *Insect Mol. Biol.*, 19(6): 777-786.

Chen J, Zhang DW, 2015. Molecular cloning, tissue distribution and temperature-induced expression of two trehalose-6-phosphate synthase genes in *Blattella germanica* (Blattodea: Blattellidae). *Acta Entomologica Sinica*, 58(10): 1046-1053. [陈静, 张道伟, 2015. 德国小蠊两个海藻糖合成酶基因的克隆、组织分布及温度诱导表达分析. 昆虫学报, 58(10): 1046-1053]

Chen Q, Ma E, Behar KL, Xu T, Haddad GG, 2002. Role of trehalose phosphate synthase in anoxia tolerance and development in *Drosophila melanogaster*. *J. Biol. Chem.*, 277(5): 3274-3279.

Chung JS, 2008. A trehalose 6-phosphate synthase gene of the hemocytes of the blue crab, *Callinectes sapidus*: cloning, the expression, its enzyme activity and relationship to hemolymph trehalose levels. *Saline Systems*, 4(1): 18.

Clark MS, Thorne MA, Purać J, Burns G, Hillyard G, Popović ŽD, Grubor-Lajšić G, Worland MR, 2009. Surviving the cold: molecular analyses of insect cryoprotective dehydration in the arctic springtail *Megaphorura arctica* (Tullberg). *BMC Genomics*, 10(1): 1-19.

Elbein AD, Pan YT, Irena P, David C, 2003. New insights on trehalose: a multifunctional molecule. *Glycobiology*, 13(4): 17R-27R.

Guo Q, Hao YJ, Li Y, Zhang YJ, Ren S, Si FL, Chen B, 2015. Gene cloning, characterization and expression and enzymatic activities related to trehalose metabolism during diapause of the onion maggot *Delia antiqua* (Diptera: Anthomyiidae). *Gene*, 565(1): 106-115.

Hodek I, 1996. Diapause development, diapause termination and the end of diapause. *Eur. J. Entomol.*, 93(3): 475-487.

Howden GF, Kilby BA, 1956. Trehalose and trehalase in the locust. *Chem. Ind.*, 48: 1453-1454.

Li Y, Hao YJ, Zhang YJ, Si FL, Chen B, 2013. Cloning, bioinformatic analysis and diapause-related expression of trehalose-6-phosphate synthase gene from the onion maggot, *Delia antiqua* (Diptera: Anthomyiidae). *Acta Entomologica Sinica*, 56(4): 329-338. [李源, 郝友进, 张玉娟, 司风玲, 陈斌, 2013. 葱蝇海藻糖-6-磷酸合成酶基因的克隆、序列分析及滞育相关表达. 昆虫学报, 56(4): 329-338]

Lu MX, Yang CS, Teng XY, Zhang YC, Xu QM, 1992. Effects of temperature and photoperiod on the carbohydrate levels of the fat body and hemolymph in pupae of oak silkworm, *Antheraea pernyi*. *Acta Entomologica Sinica*, 35(1): 1-7. [陆明贤, 杨长松, 滕秀银, 张义成, 徐启茂, 1992. 柞蚕蛹脂肪体和血淋巴中糖类含量动态的温度和光周期效应. 昆虫学报, 35(1): 1-7]

Nomura M, Ishikawa Y, 2001. Dynamic changes in cold hardiness, high-temperature tolerance and trehalose content in the onion maggot, *Delia antiqua* (Diptera: Anthomyiidae), associated with the summer and winter diapause. *Appl. Entomol. Zool.*, 36(4): 443-449.

Qian HT, 1978. Diapause and voltinism of oak silkworm, *Antheraea pernyi*. *Guangxi Sericulture*, (2): 19-26. [钱惠田, 1978. 柞蚕的滞育与化性. 广西蚕业, (2): 19-26]

Qin L, 2003. Chinese Tussah. China Scientific Culture Press, Beijing. 90-92. [秦利, 2003. 中国柞蚕学. 北京: 中国科学文化出版社. 90-92]

Qin Z, Wang S, Wei P, Xu CD, Tang B, Zhang F, 2012. Molecular cloning and cold-induced expression of trehalose-6-phosphate synthase genes in *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae). *Acta Entomologica Sinica*, 55(6): 651-658. [秦资, 王甦, 魏苹, 徐彩娣, 唐斌, 张帆, 2012. 异色瓢虫海藻糖合成酶基因的克隆及低温诱导表达分析. 昆虫学报, 55(6): 651-658]

Tang B, Chen J, Yao Q, Pan ZQ, Xu WH, Wang SG, Zhang WQ, 2010. Characterization of a trehalose-6-phosphate synthase gene from *Spodoptera exigua* and its function identification through RNA interference. *J. Insect Physiol.*, 56(7): 813 – 821.

Tang B, Xu QY, Zhao LN, Wang SG, Zhang F, 2014. Progress in research on the characteristics and functions of trehalose and the *TPS* gene in insects. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 51(6): 1397 – 1405. [唐斌, 徐青叶, 赵丽娜, 王世贵, 张帆, 2014. 昆虫海藻糖及其合成酶基因的特性与功能研究进展. 应用昆虫学报, 51(6): 1397 – 1405]

Tauber MJ, Tauber CA, 1976. Insect seasonality: diapause maintenance, termination, and postdiapause development. *Annu. Rev. Entomol.*, 21(6): 81 – 107.

Thompson SN, 2003. Trehalose-the insect "blood" sugar. *Adv. Insect Physiol.*, 31(3): 205 – 285.

Xu J, Bao B, Zhang ZF, Yi YZ, Xu WH, 2009. Identification of a novel gene encoding the trehalose phosphate synthase in the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*. *Glycobiology*, 19(3): 250 – 257.

Xu WH, 2008. Advances in insect diapause. *Chinese Bulletin of Entomology*, 45(4): 143 – 148. [徐卫华, 2008. 昆虫滞育研究进展. 昆虫知识, 45(4): 143 – 148]

Yang Y, Li ZB, 2008. Study on the evolution of trehalose TPS/TPP biosynthetic pathway. *Sci-Tech Information Development & Economy*, 18(16): 123 – 125. [杨艳, 李增波, 2008. 海藻糖TPS/TPP生物合成途径的进化研究. 科技情报开发与经济, 18(16): 123 – 125]

Zhang DW, Chen J, Guo YS, 2012. Cloning and sequence analysis of trehalose phosphate sythase gene from *Sogatella furcifera*. *Heilongjiang Agricultural Sciences*, (5): 14 – 19. [张道伟, 陈静, 郭玉双, 2012. 白背飞虱海藻糖合成酶基因的克隆及序列分析. 黑龙江农业科学, (5): 14 – 19]

Zhao ZW, Huang YP, 1995. The mechanisms of regulation and control of insect diapause. *Journal of Shanxi University (Natural Science Edition)*, 18(1): 105 – 118. [赵章武, 黄永平, 1995. 昆虫滞育及其调控机制. 山西大学学报(自然科学版), 18(1): 105 – 118]

（责任编辑：袁德成）